

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19469

研究課題名(和文)シナカルセト塩酸塩による過形成副甲状腺への退縮作用の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of cinacalcet hydrochloride for regression of hyperplasia of parathyroid

研究代表者

巽 亮子 (TATSUMI, Ryoko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：60631819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナカルセト塩酸塩はカルシウム感受容体を活性化して二次性副甲状腺機能亢進症を治療するが、継続的に投与されると過形成副甲状腺を退縮させる。この機序を解明することを目的として、シナカルセト塩酸塩投与/非投与患者の副甲状腺組織における遺伝子発現の比較検討を行った。その結果、シナカルセト塩酸塩投与患者の副甲状腺ではG0静止期から細胞周期G1期への移行が促進されており、細胞周期が回復した細胞の一部にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。また、シナカルセト塩酸塩による副甲状腺主細胞から好酸性細胞への分化促進効果が検出され、シナカルセト塩酸塩の継続使用による副甲状腺への新たな作用も示された。

研究成果の概要(英文)：Cinacalcet hydrochloride is an activator of calcium-sensing receptor and used for therapies of hyperparathyroidism. In the previous study, we reported that intermittent administrations of cinacalcet for long periods promoted apoptosis in hyperplasia of parathyroid glands. Now, we examined the mechanism of the induction of apoptosis by comparing parathyroid specimens between cinacalcet-administrated and non-administrated patients. Immunohistochemistry showed a decrease of p27Kip1 expression and an increase of cells expressing c-myc in cinacalcet-administrated parathyroids, which indicated an induction of re-entry into cell-cycle from G0 static phase. A part of c-myc expressing cells co-expressed an apoptosis marker, caspase-3. These results indicated that cinacalcet induced some of static parathyroid cells to re-enter into cell cycle, but a part of them could not go through checkpoints in the way of cell cycle and followed the apoptosis route, which led the regression of glands.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：内分泌学 副甲状腺機能亢進症 シナカルセト塩酸塩

1. 研究開始当初の背景

二次性副甲状腺機能亢進症 (SHPT) は慢性腎不全の過程で進行する、血中のカルシウムやリン、ビタミン D の濃度調整不良に反応した適応症として発症し、副甲状腺細胞の増殖と過形成、副甲状腺ホルモン (PTH) の過剰な産生と分泌を特徴とする。これにより、骨吸収、血管と柔組織の石灰化などが引き起こされ、心血管系疾患のリスクを増大させることが知られている。SHPT に対する療法としてはビタミン D3 の投与が一般的に行われてきたが、重度に進行した症例に対しては効果が薄く、このような症例に対しては現在も副甲状腺摘出術などのインターベンションが行われている。

近年、SHPT の新しい治療薬としてシナカルセト塩酸塩が開発され、大きな効果が示されてきた。シナカルセトはカルシウム感知受容体 (CaSR) のアロステリック・モジュレーターとして CaSR を活性化させ、細胞内 Ca 濃度を上昇させて PTH 分泌を抑制する効果を持つ。シナカルセト投与の効果とその機序について、PTH 分泌の抑制や血中のカルシウム、リン濃度レベルの抑制などの即効的な効果については既に多くの報告があったが、シナカルセトの副甲状腺組織への退縮効果などの、遅効性であるが SHPT の根治に関わる作用についての報告については、散見されるとはいえ、その解析は未だ十分ではなかった。副甲状腺退縮のメカニズムに関しても、シナカルセトが副甲状腺細胞の増殖とアポトーシスに関与するという報告がいくつかあるが、結論は一定していない。例えば Colloton らは腎不全ラットの系を用いて、シナカルセトの投与が副甲状腺細胞の分裂増殖を阻害する一方でアポトーシスの増減は見られなかったと報告している (Colloton et al. *Kidney Int.* 67:467-476, 2005) が、Mizobuchi らは副甲状腺細胞のアポトーシスがシナカルセトにより誘導されることを腎不全ラット副甲状腺の培養系で示している (Mizobuchi et al. *Biochem. Biophys. Research. Commu.* 362:11-16, 2007)。これらの相反する結果は、この課題に対するより詳細な解析の必要を示していた。

私たちはこれまでに、アポトーシスが副甲状腺退縮の原因である可能性を検討するため、シナカルセト投与を受けていた SHPT 患

者の副甲状腺とシナカルセト投与を受けていなかった SHPT 患者の副甲状腺の組織切片を用いて、アポトーシスと細胞増殖の頻度を比較していた (Tatsumi et al. *Nephron Clin Pract.* 124:224-231, 2013)。TUNEL アッセイによるアポトーシスの頻度の解析では、非投与群で 0.3% の頻度で検出されたアポトーシスが、投与群では 1.3% に増えていた。同様の効果はヒト副甲状腺細胞の培養を用いた TUNEL 解析でも再現され、シナカルセトの培地への添加でアポトーシスの進行に重要なカスパーゼ 3 の発現が増加し、抗アポトーシスの指標である Bcl-2 の発現が低下していることも見出された。これらの結果はシナカルセトによる副甲状腺細胞へのアポトーシス誘導の可能性を支持したが、同じ検体の増殖細胞頻度を抗 Ki67 抗体による組織染色で調べたところ、シナカルセト非投与群で 0.6% であった Ki67 陽性細胞頻度が投与群では 1.8% に増大しており、細胞増殖もアポトーシスと同様にシナカルセト投与により促進されている可能性が示された。

ヒトの副甲状腺細胞は誕生後も青年期までは分裂増殖を行うが、成人後の増殖能は非常に低く、18~76 歳の副甲状腺で調べられた細胞の turn over は 1 年間で平均 5.24% であり、平均細胞寿命は約 20 年と考えられている。これは、細胞分裂の頻度が正規分布に従うと仮定すると、最も頻繁に分裂する細胞でも 3 年毎に 1 回より多く分裂することはないほど分裂能が低いことを示している。SHPT により過形成を呈する副甲状腺では、分裂増殖が比較的盛んなくつかの細胞がマルチクローナルな結節を形成して腺を肥大化させるが、SHPT の発症から副甲状腺摘出術による治療が必要となる大きさになるまでに十年以上の歳月がかかることが珍しくなく、細胞分裂の頻度は決して高いものではない。正常副甲状腺細胞のほとんどは細胞周期静止期 (G0 期) にあり、分裂増殖が刺激されると G1 期へ移行して細胞周期 (G1 S G2 M G1) の行程を一回りだけしてまた G0 期へ戻ると推測されているが、SHPT の過形成副甲状腺においてもほとんど全ての細胞が G0 期に静止していることは、上述の Ki67 陽性細胞頻度のデータからも推測される。

しかしながら患者間でアポトーシスの頻度と Ki67 陽性細胞頻度の間には強い正の相

関関係が認められ、これは単なる患者選択のバイアスによるものではなく、アポトーシスと細胞増殖の密接な関連性を示すものと考えられた。ため、私たちは副甲状腺細胞の増殖に関してさらに詳細な解析が必要であると考えた。

2. 研究の目的

シナカルセト塩酸塩の投与により促進される副甲状腺細胞のアポトーシスと細胞増殖の関係を検討し、シナカルセト塩酸塩が過形成副甲状腺の退縮を引き起こす仕組みを明らかにする。具体的には、

(1) シナカルセト塩酸塩が G0 期にある副甲状腺細胞を細胞周期 G1 期へ移行させる可能性について検討する。また、これらの細胞周期に戻った細胞がアポトーシスを起こす可能性についても検討する。

(2) 副甲状腺を構成する細胞種の比率に対するシナカルセト塩酸塩の作用を検出する。

(3) 副甲状腺細胞の遺伝子発現に対するシナカルセト塩酸塩の作用を網羅的に検索する。

3. 研究の方法

(1) シナカルセト投与と患者の副甲状腺において G0 期から G1 期へ移行する細胞の頻度が上昇することを確認するため、シナカルセト投与 / 非投与と患者の副甲状腺組織切片に対して G0 期の指標である p27Kip1 と脱 G0 期の指標である c-myc のタンパク発現について解析を行った。さらに、これらの発現細胞におけるアポトーシスをカスパーゼ 3 との二重染色により検出した。

(2) 副甲状腺好酸性細胞の増加を 25-Hydroxyvitamin D₃ 1- α -hydroxylase (CYP27B1) の発現量で検出してシナカルセト投与 / 非投与群で比較した。

(3) シナカルセト投与 / 非投与と患者の副甲状腺について次世代 miRNA シークエンスを行い、解析結果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) シナカルセト投与 / 非投与と患者の組織切片に対して G0 期の指標である p27Kip1 と脱 G0 期の指標である c-myc のタンパク発現について解析を行い、シナカルセト投与群においてほぼ全細胞における p27Kip1 発現の低

下、および c-myc 発現細胞頻度の上昇を確認した。この結果はシナカルセト塩酸塩が G0 期の細胞に作用し、G1 期への移行を促している可能性を示唆するものであった。さらにこれらの発現細胞におけるアポトーシスをカスパーゼ 3 との二重染色により検出したところ、c-myc とカスパーゼ 3 の共発現細胞がある頻度で見つかったことから、シナカルセト塩酸塩の作用により細胞周期へ復帰した副甲状腺細胞のうち一定数が、細胞周期のチェックポイントを通過することができずにアポトーシスへの経路を選択している可能性が考えられた。

(2) 患者副甲状腺における CYP27B1 の発現解析を行い、シナカルセト投与群で非投与群の約 3 倍の CYP27B1 発現を確認した。副甲状腺実質部はほとんどが主細胞と好酸性細胞で占められている。主細胞は副甲状腺で一番多く、PTH の産生と分泌を行い、好酸性細胞は主細胞に比べて大型であるが数は少なく、その細胞質はミトコンドリアに富んでおり、PTH の分泌量は主細胞よりも低い。好酸性細胞は副甲状腺中には思春期以降に観察され、加齢に従い増加することから主細胞が分化転換したものと考えられている。CYP27B1 はミトコンドリアに局在するので、シナカルセト投与群での CYP27B1 の発現増加はミトコンドリアに富む好酸性細胞の増加を示すものと推測され、実際に組織切片の染色解析でも好酸性細胞の割合の増加は確認されている。好酸性細胞は主細胞のような活発な PTH 分泌は行わないので、シナカルセトが主細胞から好酸性細胞への分化転換を促進し、腺の PTH 分泌速度を減少させている可能性が考えられた。

(3) micro-RNA(miRNA)はタンパク質に翻訳されない短い RNA であり、遺伝子発現の調節機能を持つと考えられている。副甲状腺ホルモン(PTH)が過剰に産生される過形成副甲状腺においては、通常の次世代 RNA-シークエンスでは大量に存在する PTH mRNA のために他の mRNA の検出に影響する可能性が考えられたため、網羅的な miRNA の検出を行った。シナカルセト処方 / 非処方患者の副甲状腺から抽出した miRNA について、それぞれ 100 万リード以上の配列について解析したところ、約 25%が既知の miRNA 約 2600 種類に相当した。いずれかの腺で 1 万リード以上検出

されたものは72種類、1000リード以上1万リード以下のものは103種類あった。そのうち、シナカルセト処方患者の副甲状腺で非処方のもよりも2倍以上の発現が検出されたものは約40種類あり、最大で4000倍の発現差があった。シナカルセト非処方の副甲状腺で処方ものもよりも2倍以上の発現が検出されたものは約120種類あり、最大で25倍の発現差があった。これらの中にシナカルセトにより発現が制御されているものがあると思われた。今後、解析を進め、標的遺伝子の予測と検出を行う予定である。

以上の結果より、シナカルセト塩酸塩の過形成副甲状腺に対する遅効効果として、副甲状腺細胞のアポトーシス誘導促進が明らかになった。その機序として、シナカルセト塩酸塩によるG0静止期細胞の細胞周期G1期への移行の促進と、細胞周期に復帰した細胞の一部で、細胞周期のチェックポイントを利用したアポトーシス経路の選択が行われていることが示唆された。シナカルセト投与患者の副甲状腺摘出術においては副甲状腺の周辺組織への癒着や腺の輪郭の不明瞭化が顕著であり、手術の妨げにもなっているが、今回の結果からは、シナカルセト塩酸塩によるアポトーシス誘導とその結果としての副甲状腺の退縮が、腺周縁部の繊維化を促進している可能性が考えられる。今回の成果を元に繊維化の阻止手法の開発が望まれる。

また、シナカルセト塩酸塩の継続投与の新たな作用として、副甲状腺主細胞の好酸性細胞への分化促進が明らかになった。過形成副甲状腺は、腫瘍の光線力学的治療法に利用されるヘム代謝経路のプロトポルフィリンを蓄積することが知られているが、過形成副甲状腺での好酸性細胞分化の促進に伴う大量のミトコンドリア産生がプロトポルフィリンの蓄積に寄与している可能性があり、今後、過形成副甲状腺の光線力学的治療法の開発において重要になると思われる。

次世代miRNAシーケンスの試みは副甲状腺では初めてのもので、今後の解析でシナカルセト塩酸塩投与による遺伝子発現制御の変化について明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

巽 亮子 (TATSUMI, Ryoko)

東海大学・医学部・助教

研究者番号: 60631819